

令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」研究報告 円偏光二色性測定法に関する研究*2

加藤 くみ子*1

Study on Circular Dichroism Spectroscopy

Kumiko SAKAI-KATO*1

Summary

Circular dichroism spectroscopy is a method for analysis of the structure of optically active substances. It is also used for determination of the secondary structure of peptides, proteins, and nucleotides. In this study, the effect of solvent on the secondary structure of magainin II was examined. Furthermore, the suitability of the reference substances supplied by the manufacturer for verification of the performance of the apparatus was examined.

Key words

Circular dichroism, Optically active substances, Peptide

1 緒言

円偏光二色性 circular dichroism は光学活性な化合物の光の吸収波長領域において、左右円偏光の吸収度合いが異なる現象を呼ぶ。鏡像異性体の円偏光二色性スペクトルは鏡像関係になるので、鏡像異性体の立体配置の識別が可能である。したがって、医薬品開発において、光学活性物質の構造解析等に用いられる¹⁾。更にペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドではその高次構造解析に円偏光二色性測定法が用いられている¹⁾。ペプチドやタンパク質は光学活性なアミノ酸が発色団となるペプチド結合により連なっているため、それらの高次構造の違いが円偏光二色性スペクトルに影響を与える。一方、核酸も、その構成単位が、発色団である塩基と不斉中心を有する糖との結合によるため、円偏光二色性が観察され、らせん構造等の解析に利用可能である。

本研究では、ペプチドを用いた円偏光二色性測定法に与える溶媒の影響を調べた。また、筆者らは、円偏光二色性測定法の標準化研究として、海外薬局方の試験法を参考に、機器性能の確認手法の研究を行い、有害試薬を用いない方法等に関する知見を得ている²⁾。本研究では、機器性能に用いられる試薬について更に情報を取得した。

2 ペプチドの二次構造解析における溶媒の影響

円偏光二色性測定法はペプチドの二次構造解析に汎用される。そこで、モデルペプチドとして、アフリカツメガエルより単離された抗菌性ペプチドである magainin II を用いて、溶媒が二次構造解析へ与える影響を調べた。また、タンパク質二次構造解析プログラムを用い、二次構造中の α -ヘリックス含

*1 北里大学薬学部 東京都港区白金5-9-1 (〒108-8641)

School of Pharmacy, Kitasato University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

*2 本研究は一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の令和2年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」事業により行ったものである。

量の推定を行った。

2.1 溶媒の円偏光二色性スペクトル

円偏光二色性スペクトルの測定に使用する溶媒は、試料の測定波長領域に吸収がなく十分に透明であるものを選択しなければならない。そこで、複数の溶媒について溶媒自身の円偏光二色性スペクトルを測定した。Fig. 1に水、10mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)、メタノール、エタノール (99.5)、アセトニトリル、2,2,2-トリフルオロエタノール、及びクロロホルムの円偏光二色性スペクトルを示す。クロロホルム以外は、190-300nmで平坦なスペクトルとなった。クロロホルムのスペクトルより、クロロホルムにペプチドを溶解することで230nm以下の波長領域ではノイズが大きくペプチドの測定が難しいことが示されたため、magainin IIの円偏光二色性スペクトル測定では、クロロホルム以外の溶媒を用いることとした。

2.2 magainin IIの円偏光二色性スペクトルに及ぼす溶媒の影響

magainin IIの抗菌作用は、両親媒性の α -ヘリックス構造が寄与していることが知られている³⁾。そこで、様々な溶媒中でのmagainin IIの α -ヘリックス含量を調査した。 α -ヘリックス含量の推定には、日本分光タンパク質二次構造解析プログラムJWSSE-513を用いた⁴⁾。

magainin IIの測定データをモル楕円率に換算し、スペクトル表示した結果がFig. 2である。Fig. 2に示す通り、溶媒によりmagainin IIの構造が大きく変化することが分かった。Table 1に示すように、プログラム解析により推定された α -ヘリックス含量は、水系溶媒中より、有機溶媒中のほうが大きく、Fig. 1でも α -ヘリックス構造に観察される208, 222nm付近の負の極大ピークが観察された。これは過去の報告とも一致している³⁾。2,2,2-トリフルオロエタノールは二次構造の安定化に寄与する溶媒として、円偏光二色性の研究で汎用されてい

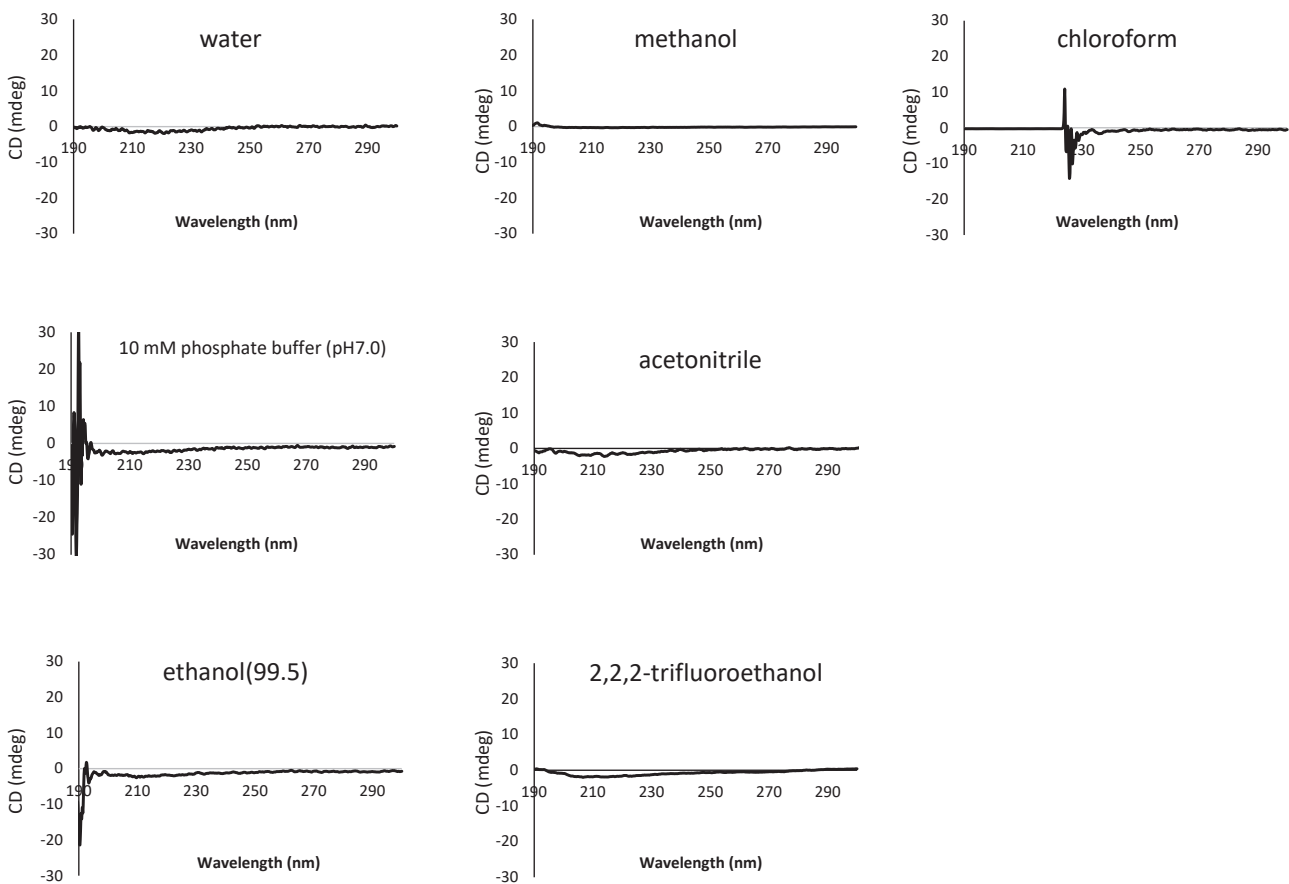


Fig. 1 種々の溶媒の円偏光二色性スペクトル

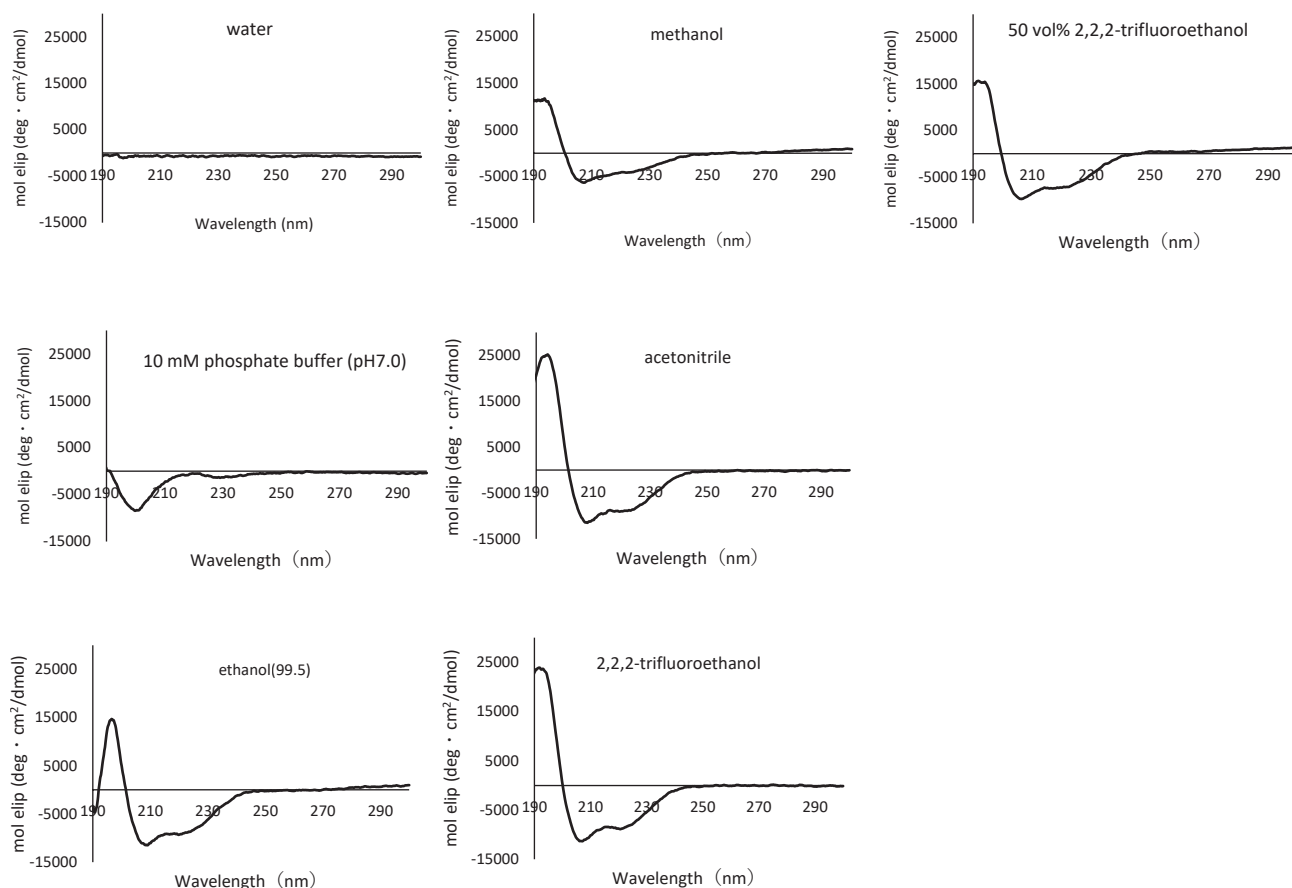


Fig. 2 種々の溶媒に溶解したmagainin IIの円偏光二色性スペクトル

Table 1 種々の溶媒中におけるmagainin IIのヘリックス含量 (%)

溶媒	α -ヘリックス含量 (%)
水	0
リン酸緩衝液	2.1
エタノール (99.5)	7.5
メタノール	12.2
アセトニトリル	28.8
2,2,2-トリフルオロエタノール	33.5
50 vol% 2,2,2-トリフルオロエタノール	22.8

る⁵⁾。特に、水系溶媒との混合溶媒は、生体膜を模した溶媒としてしばしば利用される⁶⁾。そこで50 vol% 2,2,2-トリフルオロエタノールを用いて円偏光二色性スペクトルを取得し α -ヘリックス含量を推定したところ、含量は23%であった。この値は、40 vol% 2,2,2-トリフルオロエタノール中のmagainin IIの α -ヘリックス含量を、Provencherらにより開発された統計学的コンピュータプログラ

ム⁷⁾を用いて推測した報告値26%と類似していた³⁾。

以上の結果より、測定溶媒によりペプチドの二次構造が大きく変わる事例もあるため、二次構造解析の際に溶媒の選択、測定条件の記載に留意する必要がある。

[測定条件]

試薬：0.1 mg/mL magainin II (Bachem AG)

エタノール (99.5) (ナカライテスク株式会社)

メタノール (ナカライテスク株式会社)
 アセトニトリル (関東化学株式会社)
 2,2,2-トリフルオロエタノール (富士フイルム和光純薬株式会社)

[CD測定条件]

円二色性分散計 (JASCO J-720 日本分光株式会社)
 セル：二つ口セル (Φ 22 × 1 mm)

[CD測定の測定条件]

感度：Standard

データ取り込み間隔：0.2 nm

走査モード Continuous

走査速度：100 nm/min

レスポンス：1s

バンド幅：1 nm

積算回数：10回

185 nm から 340 nm まで測定するとき、
 290.5 nm における $\Delta\epsilon$ は +2.2 ~ +2.5 である。
 192.5 nm における $\Delta\epsilon$ は -4.3 ~ -5 である。

日本分光株式会社製の円二色性分光光度計の説明書には、機器付属の試薬 (CD測定用 *d*-しょうのう-10-スルホン酸アンモニウム Ammonium *d*-Camphor-10-sulfonate 片山化学工業株式会社製) を用いて「円偏光二色性の正確さ」に相当する校正法が記載されているが、「変調の直線性」については示されていない。一般試験法案「3.2 変調の直線性」には、*d*-カンファスルホン酸アンモニウムを用いた事例が記載されているため、同じ化合物である上記のCD測定用 *d*-しょうのう-10-スルホン酸アンモニウムが、「変調の直線性」へ使用可能か調べた。

Fig. 3に得られた円偏光二色性スペクトルを示す。290.5 nm におけるモル円二色性 $\Delta\epsilon$ は 2.37 (3回の平均)、192.5 nm における $\Delta\epsilon$ は -5.0 (3回の平均) であり、いずれも判定基準「290.5 nm における $\Delta\epsilon$ は +2.2 ~ +2.5 である。192.5 nm における $\Delta\epsilon$ は -4.3 ~ -5 である。」に適合していた。

したがって、測定機器に付属の上記試薬で「変調の直線性」の確認を行うことも可能であると考えられる。

[測定条件]

試薬：CD測定用 *d*-しょうのう-10-スルホン酸アンモニウム Ammonium *d*-Camphor-10-sulfonate (片山化学工業株式会社製)

[CD測定条件]

円二色性分散計 (JASCO J-720 日本分光株式会社)
 セル：セル：二つ口セル (Φ 22 × 1 mm)

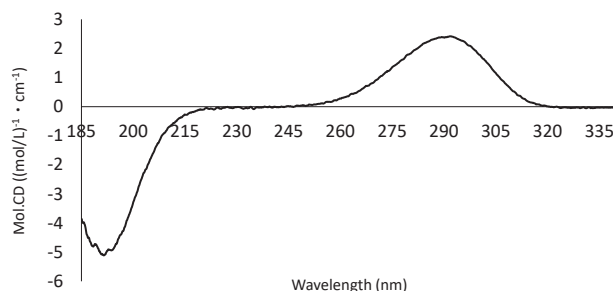


Fig.3 CD測定用 *d*-しょうのう-10-スルホン酸アンモニウムを用いた変調の直線性確認のための円偏光二色性スペクトル

3 装置性能の確認に用いる試薬

装置性能の確認は、欧州薬局方に記載の一般試験法⁸⁾ 及び検証研究²⁾ を参考とした試験法案が、以下の内容で意見公募のために公開された¹⁾。

3.1 円偏光二色性の正確さ

$\Delta\epsilon$ が既知である物質、例えばイソアンドロステロン、*d*-カンファスルホン酸アンモニウムなどを用いて校正する (機器メーカーの推奨品を用いてもよい)。イソアンドロステロンを用いる場合は、イソアンドロステロン 10.0 mg を正確に量り、エタノール (99.5) に溶かし、正確に 10 mL とする。層長 10 mm のセルを用いて、調製した溶液の円偏光二色性スペクトルを 280 nm から 360 nm まで測定するとき、304 nm における $\Delta\epsilon$ は +3.3 である。

3.2 変調の直線性

$\Delta\epsilon$ が既知である物質、例えば *d*-カンファスルホン酸アンモニウムなどを用いて校正する (機器メーカーの推奨品を用いてもよい)。*d*-カンファスルホン酸アンモニウムを用いる場合は、*d*-カンファスルホン酸アンモニウム 6.0 mg を正確に量り、水に溶かし、正確に 10 mL とする。層長 1 mm のセルを用いて、調製した溶液の円偏光二色性スペクトルを

[CD測定の実験条件]

感度：Standard

データ取り込み間隔：0.1 nm

走査モード Continuous

走査速度：100 nm/min

レスポンス：1 s

バンド幅：1 nm

積算回数 3回

4 まとめ

本研究では、円偏光二色性測定のための技術情報を提供するために、ペプチド測定における溶媒の影響、及び機器性能の確認に用いられる試薬について報告した。低分子化合物、高分子化合物に加え、中分子化合物である核酸やペプチドを有効成分とする医薬品の開発が増加している。その特性解析に円偏光二色性測定法は有用であり、今後、円偏光二色性測定法の更なる活用が期待される。

文献

- 1) 日本薬局方収載原案に関するご意見の募集について（令和3年9月分 その1）、2.28円偏光二色性測定法、医薬品医療機器総合機構 <https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/pub-comments/jp/0195.html>, (accessed 2021-10-16), (日本薬局方フォーラム, 2021, 30 (3), p.291-292.に掲載).
- 2) Sakai-Kato, K.; Yoshida, K.; Ohgita, T.; Takechi-Haraya, Y.; Demizu, Y.; Saito, H. Refining calibration procedures of circular dichroism spectrometer to improve usability, *Anal. Sci.* 2019, **35**, p.1275-1278.
- 3) Chen, H.-C.; Brown, J.H.; Morell, J. L. Huang C.M. Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 1988, **236**, p.462-466.
- 4) Reed J.; Reed, T. A. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an nmR and CD study using a synthetic actin peptide. *Anal. Biochem.* 1997, **254**, p.36-40.
- 5) Sonnichsen, F. D.; Eyk, J.E.van.; Hodges, R.S.; Sykes, B.D. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an nmR and CD study using a synthetic actin peptide. *Biochem.* 1992, **31**, p.8790-8798.
- 6) Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* 1998, **1376**, p.391-400.
- 7) Provencher, S.W.: Contin (Version 2) users manual. Technical Report EMBL-DA07. Computer Physics Communications Program Library. Queen's University of Belfast, 1984.
- 8) 2.2.41 Circular Dichroism, European Pharmacopoeia.